

• 临床研究 •

涎腺良恶性病变组织中人乳头瘤病毒基因的检测分析

福建医科大学口腔医学院/附属口腔医院 福建省口腔疾病研究重点实验室 福建省口腔生物材料工程技术研究中心 福建省高校口腔医学重点实验室 (福州 350004) 刘玲玲 陈泽希 乔馨玮 韦柔漪 陈日新 孙婉霞 程幼新

【摘要】 目的 探讨涎腺良恶性疾病与人乳头瘤病毒 (human papilloma virus, HPV) 感染的相关性。**方法** 采用 HPV 基因通用引物 GP5+/GP6+ 和 CPI/CPIIG 应用聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 技术对 33 例涎腺恶性肿瘤、35 例涎腺良性肿瘤及 18 例涎腺良性非肿瘤病变石蜡包埋组织进行 HPV 基因检测, PCR 产物采用琼脂糖凝胶电泳与测序进行鉴定。通用引物 PCR 阳性样本进一步采用 HPV16/18 型特异性引物进行 PCR 检测。**结果** 86 例涎腺良恶性病变组织中 HPV 基因总检出率为 25.6% (22/86), 其中恶性肿瘤为 18.2% (6/33), 良性肿瘤为 25.7% (9/35), 良性非肿瘤病变为 38.9% (7/18), 三者间比较, 差异无统计学意义 ($\chi^2 = 2.624$, $P = 0.269$)。HPV16 和 HPV18 基因在上述阳性样本中均未检出。**结论** 3 种涎腺良恶性病变组织中均存在 HPV 感染, 但 HPV 感染可能并非涎腺恶性肿瘤的主要致病因素。

【关键词】 涎腺肿瘤; 人乳头瘤病毒; PCR

【中图分类号】 R739.87 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1002-2600(2021)03-0007-04

Detection of HPV DNA in benign and malignant lesions of salivary gland LIU Lingling, CHEN Zexi, QIAO Xinwei, WEI Rouyi, CHEN Rixin, SUN Wanxia, CHENG Youxin. Fujian Provincial Key Laboratory of Oral Diseases & Fujian Provincial Engineering Research Center of Oral Biomaterial & Stomatological Key Lab of Fujian College and University, School of Stomatology, Fujian Medical University Affiliated stomatological Hospital, Fuzhou, Fujian 350004, China

【Abstract】 Objective To evaluate the correlation between benign and malignant lesions of salivary gland and HPV infection. **Methods** Polymerase chain reaction (PCR) with consensus primers GP5+/GP6+ and CPI/CPIIG was used to detect HPV DNA in 86 cases of formalin-fixed, paraffin-embedded salivary gland lesion tissues including 33 cases of malignant tumors, 35 cases of benign tumors and 18 cases of non-neoplastic lesions. Type-specific PCR was further conducted to detect E6 gene of HPV16 and HPV18 in positive tissues of consensus PCR. **Results** The results showed that the total positive rate of HPV DNA was 25.6% (22/86), and it was 18.2% (6/33), 25.7% (9/35) and 38.9% (7/18) for malignant tumors, benign tumors and non-neoplastic lesions, respectively. There was no statistical significance among these three groups ($\chi^2 = 2.624$, $P = 0.269$). HPV16 and HPV18 genes were not detected in the above positive samples. **Conclusion** HPV exists in different kinds of salivary gland lesion tissues, but it may not play a crucial role in carcinogenesis of malignant salivary gland tumors.

【Key words】 salivary gland tumors; human papilloma virus; PCR

人乳头瘤病毒 (human papilloma virus, HPV) 是目前公认的一种与肿瘤的发生发展相关的病毒, 其在宫颈肿瘤致病过程中所起的作用早已被证实。近年来, HPV 与头颈部、口腔颌面部肿瘤的关系受到了广泛的关注, 且已有大量证据证实口腔咽部鳞状细胞癌的发生发展与 HPV 感染有关^[1]。涎腺肿瘤是口腔颌面部所特有的第二大类肿瘤, 其病理组织类型复杂多样, 发病机制尚不明确。有研究发现涎腺肿瘤组织中存在 HPV 基因, 但涎腺肿瘤与 HPV 感染相关性的研究国内外报道较少, 是

否相关目前尚无定论。因此, 本研究收集了 86 例涎腺良恶性病变石蜡包埋组织, 采用 PCR 技术进行 HPV 基因检测, 旨在探讨涎腺良恶性病变与人乳头瘤病毒感染的相关性, 以期为其临床防治提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 临床资料: 86 例涎腺良恶性病变石蜡包埋组织标本来源于解放军联勤保障部队第 900 医院病理科 2015—2017 年经病理确诊并有临床完整资料的涎腺良恶性病变患者。其中恶性肿瘤 33 例 (黏液

表皮样癌 10 例, 腺样囊性癌 11 例, 腺泡细胞癌 3 例, 腺癌 1 例, 淋巴上皮癌 1 例, 基底细胞腺癌 1 例, 淋巴瘤 1 例, 淋巴上皮瘤样癌 1 例, 上皮肌上皮癌 1 例, 未分化癌 1 例, 混合瘤 1 例, 浸润性癌 1 例), 良性肿瘤 35 例 (多形性腺瘤 19 例, 乳头状淋巴囊腺瘤 11 例, 基底细胞腺瘤 4 例, 皮质腺瘤 1 例), 良性非肿瘤病变 18 例 (慢性炎症 8 例, 淋巴组织增生 4 例, 囊肿伴慢性炎症 2 例, Mikulicz 病 2 例, 淋巴上皮囊肿 1 例, 脂肪组织增生 1 例)。其中男 53 例, 女 33 例, 男:女 \approx 1.6:1; 年龄 15~87 岁, 平均年龄 49.2 岁。

1.2 试剂: 石蜡包埋标本基因组 DNA 提取试剂盒 (BIOMIGA, EZgene™ FFPE DNA Miniprep Kit) 购自厦门鹭隆生物科技发展有限公司, PCR 试剂及琼脂糖凝胶电泳相关试剂购自北京全式金生物技术有限公司; 内参基因 GAPDH 引物、HPV DNA 通用引物 GP5+/GP6+、CPI/CPIIG 及 HPV16/18 特异性引物由福州尚亚生物技术有限公司合成, 引物信息详见表 1。

表 1 PCR 引物信息表

引物名称	引物序列	PCR 产物长度	检测 基因
GAPDH-F	5'-AACGGATT-TGGTCG-TATTG-3'	208 bp	GAPDH
GAPDH-R	5'-GGAAGATGGTGATGG-GATT-3'		
GP5+	5'-TTTGTTACTGTGG-TAGATACTAC-3'	150 bp	HPV L1
GP6+	5'-GAAAAATAAACTGTA-AATCAT ATTC-3'		
CPI	5'-TTATCWTATGCCAYT-GTACCAT-3'	188 bp	HPV E1
CPIIG	5'-ATGTTAATWSAGCCWC-CAAAATT-3'		
HPV16 E6-F	5'-GTCAAAAGCCACTGT-GTCCT-3'	499 bp	HPV16 E6
HPV16 E6-R	5'-CCATCCATTACATCCCG-TAC-3'		
HPV18 E6-F	5'-CCGAGCACGACAG-GAACGACT-3'	172 bp	HPV18 E6
HPV18 E6-R	5'-TCGTTTCTCTCTCT-GAGTCGCTT-3'		

1.3 方法:

1.3.1 石蜡包埋组织 DNA 的提取: 取 5 μ m 厚石蜡切片 5 张, 加入 1 mL 二甲苯浸没, 充分漩涡振荡, 10 000 g 离心 2 min, 弃上清。用 1 mL 无水乙醇将组织悬起, 13 000 g 离心 2 min 后弃上清, 离

心管开盖在 37 $^{\circ}$ C 中干燥 15 min, 或直至残留的乙醇完全挥发。之后按照试剂盒说明书进行 DNA 提取。

1.3.2 内参 PCR: 提取的 DNA 取 200 ng 为模板, 反应总体积为 25 μ L, 反应参数为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 25 个循环: 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 循环结束后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。产物取 5 μ L 经 2% 琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯下观察。每组实验均设置阴性对照 (灭菌一级纯水)。

1.3.3 通用引物 PCR: 对于证实成功提取 DNA 的样本采用通用引物 GP5+/GP6+ 进行两轮 PCR 扩增。第 1 轮 PCR: 提取的 DNA 取 200 ng 为模板, 反应总体积为 25 μ L, 反应参数为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 25 个循环: 94 $^{\circ}$ C 30 s, 50 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 循环结束后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。第 2 轮 PCR: 取 2 μ L 第一轮 PCR 产物为模板, 反应体积 50 μ L, 反应参数为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 25 个循环: 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 循环结束后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。50 μ L PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯下观察。每组实验均设置阳性对照 (Hela 细胞 DNA) 和阴性对照 (灭菌一级纯水)。将阳性电泳条带切下, 交由测序公司 [铂尚生物技术 (上海) 有限公司-福州测序部] 纯化、测序。PCR 阴性样本进一步采用通用引物 CPI/CPIIG 进行 PCR, 以检测 HPV E1 基因, PCR 方法同 GP5+/GP6+。

1.3.4 特异性引物 PCR: 测序阳性样本进一步以 HPV16/18 型特异性引物进行 PCR 检测, 样本 DNA 取 200 ng 为模板, 反应总体积为 50 μ L, 反应参数为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 40 个循环: 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 循环结束后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。50 μ L PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯下观察。每组实验均设置阳性对照 (HPV18 阳性对照: Hela 细胞 DNA; HPV16 阳性对照: SiHa 细胞 DNA) 和阴性对照 (灭菌一级纯水)。

1.4 结果判断:

1.4.1 内参 PCR: 紫外灯下, 阳性对照组和样品在 208 bp 处出现橘黄色条带, 阴性对照组对应位置无条带, 阳性条带测序序列在 NCBI 上进行 BLAST 比对, 与基因库中 GAPDH 基因该部分序列完全一致, 即判定基因组 DNA 提取成功。

1.4.2 通用引物 PCR: 紫外灯下, 在阳性对照组 150 bp (GP5+/GP6+) /188 bp (CPI/CPIIG) 处出现橘黄色条带、阴性对照组对应位置无条带的前提下, 样品在同一位置出现条带初步定为阳性, 无

条带则为阴性。阳性条带测序序列在 NCBI 上进行 BLAST 比对, 与基因库中 HPV 任意一型 L1 (GP5+/GP6+) /E1 (CPI/CPIIG) 基因该部分序列一致性 $\geq 90\%$, 即判定为阳性。

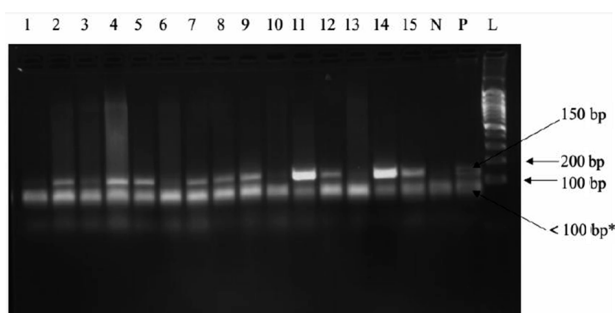
1.4.3 特异性引物 PCR: 紫外灯下, 在阳性对照组 499 bp (HPV16) /172 bp (HPV18) 处出现橘黄色条带、阴性对照组对应位置无条带的前提下, 样品在同一位置出现条带初步定为阳性, 无条带则为阴性。阳性条带测序序列在 NCBI 上进行 BLAST 比对, 与基因库中 HPV16/18 型 E6 基因该部分序列完全一致, 即判定为阳性。

1.5 统计学分析: 数据输入 SPSS 23.0 软件, 采用 χ^2 检验对实验结果进行统计分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 内参 PCR: 阳性对照组与 86 例样本均成功扩增出内参基因 GAPDH, 所有样本的基因组 DNA 均提取成功。

2.2 通用引物 PCR: 经通用引物 GP5+/GP6+ PCR 扩增、电泳 (图 1)、测序及 BLAST 比对, 86 例涎腺良恶性病变组织中检出阳性样本 22 例, 其中恶性肿瘤阳性样本 6 例, 阳性率为 18.2% (6/33); 良性肿瘤阳性样本 9 例, 阳性率为 25.7% (9/35); 良性非肿瘤病变阳性样本 7 例, 阳性率为 38.9% (7/18)。三者间阳性率比较, 差异无统计学意义 (表 2)。通用引物 CPI/CPIIG 在上述阴性样本中均未检出。



注: P, 阳性对照; N, 阴性对照; L, DNA Ladder; 1、3、6、10、13, 阴性样本; 2、4、5、7、8、9、11、12、14、15, 阳性样本; *, 引物二聚体。

图 1 通用引物 GP5+/GP6+ PCR 产物 (150 bp) 部分电泳图

2.3 特异性引物 PCR: 为了确定涎腺恶性肿瘤与 HPV 感染是否相关, 本研究对涎腺恶性肿瘤阳性样本进一步以 HPV16/18 型特异性引物进行 PCR

表 2 3 组涎腺良恶性病变组织 PCR 检测结果

组别	总例数	阳性例数	阴性例数	阳性率/%
涎腺恶性肿瘤	33	6	27	18.2
涎腺良性肿瘤	35	9	26	25.7
涎腺良性非肿瘤病变	18	7	11	38.9

注: 3 组阳性率比较, 差异无统计学意义 ($\chi^2 = 2.624$, $P = 0.269$)。

检测, 然而, HPV16/18 E6 基因在上述阳性样本中均未检出。

3 讨论

涎腺肿瘤与 HPV 感染相关性的研究国内外报道较少, 而在已有的研究结果中, 肿瘤组织中 HPV 检出率差异较大^[2-8], 是否相关目前尚无定论, 可能与 HPV 亚型繁多、检测方法、标本例数、地域差别等因素有关。

本研究在方法上, 总结了前人的研究经验, 采用通用引物中 PCR 产物较短的 GP5+/GP6+ 组合, 且进行两轮 PCR 以提高其灵敏度^[9]。此外, GP5+/GP6+ 阴性样本进一步采用通用引物 CPI/CPIIG 进行 HPV E1 基因检测, 以排除因基因组整合致 L1 基因缺失而出现的假阴性^[9], 进一步提高了 HPV 基因检测的灵敏度。然而, 灵敏度提高的同时, 检测的特异度随之下降, 假阳性率也随之升高。经过初步的 PCR 检测, 3 组样本阳性率高达 50%~60% (未在结果中显示)。因此, 本研究进一步对 PCR 产物进行测序, 测序结果在 NCBI 上进行 BLAST 比对分析, 最终涎腺恶性肿瘤阳性率为 18.2% (6/33), 良性肿瘤为 25.7% (9/35), 良性非肿瘤病变为 38.9% (7/18), 剔除了大量的假阳性样本, 有效提高了检测的准确性。检测结果表明, 3 种涎腺良恶性病变组织中均存在 HPV 感染。

大量实验证明高危型 HPV 与一些恶性肿瘤的发生有关, 其中以 HPV 16/18 型最为常见^[10]。HPV16/18 也是头颈肿瘤中最常见的 HPV 亚型, 其中 HPV16 超过 90%^[11]。为了确定涎腺恶性肿瘤与 HPV 感染是否相关, 本研究对涎腺恶性肿瘤阳性样本进一步以 HPV16/18 型特异性引物进行 PCR 检测, 然而, HPV16/18 型 E6 基因在上述阳性样本中均未检出。由此可见, HPV 感染可能并非涎腺恶性肿瘤的主要致病因素。

然而, HPV 亚型繁多, 且受标本例数和地域的限制, 涎腺恶性肿瘤与 HPV 感染的确切关系仍有待大量数据进一步证实。HPV 感染在涎腺良性病变中是否发挥作用也有待进一步研究。

参考文献

- [1] Boscolo-Rizzo P, Del Mistro A, Bussu F, et al. New insights into human papillomavirus-associated head and neck squamous cell carcinoma [J]. Acta Otorhinolaryngol Ital, 2013, 33 (2): 77-87.
- [2] Teymoortash A, Bohne F, Jonsdottir T, et al. Human papilloma virus (HPV) is not implicated in the etiology of Warthin's tumor of the parotid gland [J]. Acta Otolaryngol, 2013, 133 (9): 972-976.
- [3] Haeggbloom L, Ursu R G, Mirzaie L, et al. No evidence for human papillomavirus having a causal role in salivary gland tumors [J]. Diagn Pathol, 2018, 13 (1): 44.
- [4] Isayeva T, Said-Al-Naief N, Ren Z, et al. Salivary mucoepithelial carcinoma: demonstration of transcriptionally active human papillomavirus 16/18 [J]. Head Neck Pathol, 2013, 7 (2): 135-148.
- [5] Xu B, Wang L, Borsu L, et al. A proportion of primary squamous cell carcinomas of the parotid gland harbour high-risk human papillomavirus [J]. Histopathology, 2016, 69 (6): 921-929.
- [6] 孙玉满, 吴蒙, 韩凤艳, 等. 涎腺腺样囊性癌组织中 HPV 感染及 p53、p16、EGFR、Cdc2 蛋白表达与预后的关系 [J]. 临床与实验病理学杂志, 2017, 33 (4): 393-398.
- [7] 陈十燕, 龚宏勋, 王茂鑫, 等. 腮腺黏液表皮样癌与人乳头瘤病毒感染的相关性研究 [J]. 中国耳鼻咽喉头颈外科, 2017, 24 (5): 237-238.
- [8] 余杨杨, 杨靖, 张敏, 等. 人乳头状瘤病毒与涎腺肿瘤相关性的系统评价 [J]. 国际病毒学杂志, 2017, 24 (4): 251-255.
- [9] Isayeva T, Li Y, Maswahu D, et al. Human papillomavirus in non-oro-pharyngeal head and neck cancers: a systematic literature review [J]. Head Neck Pathol, 2012, 6 (Suppl 1): S104-S120.
- [10] 宋冀晖, 王晶, 邹克谦, 等. C-erbB-2、PCNA 表达及 HPV 感染与涎腺肿瘤关系的研究 [J]. 陕西医学杂志, 2009, 38 (6): 702-705.
- [11] 张春林, 陈月红, 邓泽义, 等. 中国口腔癌中高危型 HPV 感染率的 Meta 分析 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2016, 23 (10): 682-689.

• 临床研究 •

成人登革热合并低钾血症的临床特征及其影响因素分析

福建医科大学孟超肝胆医院感染科 (福州 350025) 杨惠安 俞晓玲¹ 官升灿 叶寒辉²

【摘要】 目的 探讨成人登革热合并低钾血症的临床特征, 并分析其影响因素。方法 回顾性分析我院收治的 363 例成人登革热的临床资料, 根据入院血钾水平分为低钾血症组 ($<3.5 \text{ mmol/L}$) 和正常血钾组 ($3.5 \sim 5.3 \text{ mmol/L}$), 采用单因素分析和多因素 logistic 回归分析探讨低钾血症发生的相关因素。结果 成人登革热合并低钾血症 179 例 (49.31%), 正常血钾组 184 例 (50.69%)。成人登革热病例低钾血症组和正常血钾组在乏力症状指标上差异有统计学意义 ($\chi^2 = 4.291$, $P = 0.036$), 其余指标差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。经单因素与多因素 logistic 回归分析结果显示, 入院前病程 $\leq 3 \text{ d}$ [$OR = 1.906$, 95% CI (1.247, 2.914), $P = 0.003$]、合并高血压病 [$OR = 2.166$, 95% CI (1.153, 4.067), $P = 0.016$] 是成人登革热患者低钾血症的危险因素。结论 成人登革热患者低钾血症发生率高, 尤其是疾病早期及合并高血压患者, 因此, 在治疗期间, 应密切关注患者的血钾情况并及时补钾。

【关键词】 登革热; 低钾血症; 危险因素

【中图分类号】 R512.8; R373.3⁺3 **【文献标识码】** B **【文章编号】** 1002-2600(2021)03-0010-05

Analysis of clinical characteristics and influencing factors of hypokalemia in adult patients with dengue

YANG Huian, YU Xiaoling, GUAN Shengcan, YE Hanhui. Department of Infectious Diseases, Mengchao Hepatobiliary Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou, Fujian 350025, China

【Abstract】 **Objective** To investigate the clinical characteristics and the influencing factors of hypokalemia in adult patients with dengue. **Methods** The clinical data of 363 patients with dengue in adults admitted to Mengchao Hepatobiliary Hospital of Fujian Medical University were retrospectively analyzed. The patients were divided into hypokalemia group ($<3.5 \text{ mmol/L}$) and normal potassium group ($\geq 3.5 \text{ mmol/L}$) based on the first serum potassium level. The influencing factors of

基金项目: 福建省感染性疾病临床重点专科建设项目; 福州市感染病医学中心建设项目 (2018080306)

1 药学部; 2 通信作者, Email: yehanui@163.com